

골다공증 동물 모델에서 골밀도 변화에 관한 카텝신 K 억제제와 부갑상선호르몬 병용요법의 효과

이승훈 · 고정민 · 이영선¹ · 김범준 · 최제용² · 김기수

울산대학교 의과대학 서울아산병원 내분비대사내과, 아산생명과학연구소¹, 경북대학교 의과대학 생화학 · 세포생물학교실²

The Effects of Combination Therapy of Cathepsin K Inhibitor and PTH on Change in Bone Mineral Density in an Animal Model of Osteoporosis

Seung Hun Lee, Jung-Min Koh, Young-Sun Lee¹, Beom-Jun Kim, Je-Yong Choi², Ghi-Su Kim

Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, Seoul; Asan Institute for Life Sciences¹, Seoul; Department of Biochemistry and Cell Biology², Kyungpook National University School of Medicine, Daegu, Korea

Background: We hypothesized that combination therapy of cathepsin K inhibitor (CTKi) and human parathyroid hormone (1-34) (teriparatide, PTH) would overcome the coupling phenomenon of bone resorption and formation and thus may rapidly increase bone mass.

Methods: We selected a dose of zoledronic acid (ZA) that had shown similar effects with CTKi on body bone mineral density (BMD) change during the preliminary experiment. Female mice were subjected to ovariectomized (OVX control) or a sham operation (SHAM group). The mice were treated with CTKi (CTKi group), ZA (ZA group), PTH (PTH group) or with a combination of PTH with ZA (ZA + PTH group) or CTKi (CTKi + PTH group) for 8 weeks. Total BMD was measured before the operation and at 4 and 8 weeks.

Results: In the preliminary results, 10 µg/kg of ZA showed similar BMD changes with CTKi. Compared with the OVX control, BMD in the SHAM, ZA, CTKi, PTH, ZA + PTH, and CTKi + PTH groups was significantly increased after treatment. BMD in the CTKi + PTH group, but not in the ZA + PTH group increased more significantly than in the PTH group at the end of treatment. Compared with the OVX control, changes in BMD in the SHAM, ZA, CTKi, PTH, ZA + PTH, and CTKi + PTH groups increased significantly after 8 weeks of treatment. The change in BMD in the CTKi + PTH group, but not in the ZA + PTH group was more significantly increased than the change in BMD in the PTH group.

Conclusion: When combined with PTH, CTKi augmented the anabolic action of PTH. Therefore, combination therapy with CTKi and PTH might be a new therapeutic modality capable of overcoming the coupling phenomenon, thereby markedly and rapidly increasing bone mass. (*Endocrinol Metab* 26:303-309, 2011)

Key Words: Bisphosphonate, Cathepsin K inhibitor, Combination therapy, Coupling phenomenon, Parathyroid hormone

서 론

골다공증은 골 강도의 약화로 골절이 증가하게 되는 골격계 질환이다[1]. 폐경 후 골 소실과 골 교체가 급격히 증가하면서 골다공증이 발생하게 된다[2,3]. 현재 쓰이고 있는 골다공증 치료제는 기전

으로 볼 때 크게 골 흡수 억제제와 골 형성 촉진제로 나눌 수 있다. [4]. 골 흡수 억제제인 비스포스포네이트와 골 형성 촉진제인 간헐적 부갑상선호르몬(1-34) (teriparatide, PTH) 주사 간의 병용요법은 골 흡수를 감소시키는 동시에 골 형성을 증가시킬 수 있어 각각의 단일 제제에 비해 더 많은 골 양의 증가를 가져오리라 기대되었으나 기대

Received: 15 March 2011, Accepted: 14 July 2011

Corresponding author: Jung-Min Koh

Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, 388-1 Pungnap 2-dong, Songpa-gu, Seoul 138-736, Korea
Tel: +82-2-3010-3247, Fax: +82-2-3010-6962, E-mail: jmkoh@amc.seoul.kr

※ 본 연구는 대한내분비학회 2004년 젊은 연구자상, 2009년 젊은 연구자상의 지원에 의하여 이루어진 것임.

Copyright © 2011 Korean Endocrine Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

와는 달리 단독 투여에 비해 PTH의 골 형성 효과가 오히려 감소되었고, 골 양 증가에 대한 상승 효과도 관찰되지 않았다[5,6]. 비스포스포네이트 병용 시에 PTH에 의한 골 형성 작용이 감소되는 기전으로 골재형성 과정 중에 골 흡수와 골 형성이 순차적으로 일어난다는 짝짓기 현상이 제시되고 있는데, 비스포스포네이트에 의해 골 흡수가 억제되어 연차적으로 골 형성이 억제된다는 것이다[7].

최근에 카텡신 K 억제제(cathepsin K inhibitor, CTKi)가 새로운 골 흡수 억제제로 개발되고 있는데, 카텡신 K (cathepsin K, CTK)는 파골 세포에서만 선택적으로 발현되는 중요한 시스테인 단백 분해 효소로 골 흡수에 중요한 역할을 한다[8]. CTKi는 시험관 내에서나 생체 내에서 골 흡수를 억제하였으며[9,10], 실제 약물로 개발이 되어 임상시험이 진행되고 있다[11,12]. 흥미로운 점은 CTKi가 생체에서 골 형성의 심각한 억제를 유발하지 않았다는 점인데[11-16], 이러한 결과들은 CTK를 억제 시 골 흡수와 골 형성 간의 짝짓기 현상이 일어나지 않아 골 흡수가 감소함에도 불구하고 골 형성은 이루어질 수 있음을 시사한다. 본 연구는 CTKi를 PTH와 병용 시에 골 양 증가에 대한 추가적이거나 상승작용이 나타나리라는 가정 하에, 경구용 CTKi인 OST-4077 (furan-2-carboxylic acid, 1-[1-[4-Fluoro-2-(2-oxopyrrolidin-1-yl)-phenyl]-3-oxopiperidin-4-ylcarbamoyl]-cyclohexyl)-amide) [17]과 PTH의 병용요법이 골 흡수와 골 형성 간의 짝짓기 현상을 극복하여 골 양을 급격하게 증가시킬 수 있는지 알아보고자 기획되었다.

대상 및 방법

1. 시약과 실험동물

CTK 효소 활성도 측정 키트(AnaSpec, San Jose, CA, USA), 졸레드론산(ZA; Novartis, Basel, Switzerland), PTH (Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA)를 구입하였고, 동아제약과 유한양행 연구소에서 경구용 CTKi인 OST-4077 (Dong-A Pharmaceutical, Yuhang Co., Seoul, Korea)을 제공받았다.

8주령의 암컷 C57BL/6 생쥐를 오리엔트사(Orient Bio Inc., Seongnam, Korea)에서 구입하여 실험 종료 시까지 온도($22 \pm 2^\circ\text{C}$)와 명암(12시간 주기)을 조절한 환경에서 표준 식이(Purina Mills, St. Louis, MO, USA)를 섭취시키며 사육시켰다. 12주령에 복강으로 ketamine (48 mg/kg)과 xylazine (5.6 mg/kg)을 투여하여 난소절제술이나 가짜 수술을 시행하였다. 모든 실험은 울산대학교 아산생명과학연구소 동물실험위원회 방침 및 동물실험 관련 법규를 따라 모든 실험을 진행하였다.

2. CTK 효소 억제도 분석

CTKi인 OST-4077의 사람 CTK에 대한 효소 억제도 분석을 상용화된 키트를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 측정하였다[18]. 간

단히 서술하면, 사람 CTK의 기질은 2.5 mM Z-Phe-Arg-AMC (AMC: 7-Amino-4-methyl coumarin)를 사용하며 최종 반응 버퍼의 구성은 pH 5.5인 400 mM sodium acetate buffer, 20 mM cysteine, 5 mM EDTA로 되도록 하였다. 반응 억제제의 시작을 위하여 최종 반응 버퍼에 기질과 억제제의 혼합물을 첨가하여 37°C 에서 1시간 동안 배양하였다. 기질의 가수분해의 정도는 SPECTRAmax GEMINI-XS Microplate Spectrofluorometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흥분과 방출도를 각각 353과 442 nm에서 흡광도를 측정하였다. 반응이 억제되는 정도(%)는 불활성 매개체를 포함한 대조반응과 비교하여 계산하였다.

3. 예비 동물실험

난소절제 골소실 유발 골다공증 동물 모델에서 OST-4077의 골 흡수 억제 효과와 유사한 ZA의 용량을 찾고, ZA가 PTH의 반응을 약화시키는지에 대해 다음과 같은 예비 연구를 실시하였다. 생쥐를 12주에 가짜 수술(sham operation, SHAM군, $n = 5$) 및 난소 절제(ovariectomized, OVX)를 시행하였다. 난소를 절제한 생쥐들은 여덟 군으로 나누었는데, 각각 위약을 투여한 군(OVX 대조군, $n = 5$), OST-4077 100 mg/kg [17]을 하루 2번 매일 경구로 투여한 군(CTKi, $n = 5$), ZA 10 µg/kg (ZA10, $n = 5$) [19], 20 µg/kg (ZA20, $n = 5$) [20]을 복막으로 한 번 투여한 군, ZA 10 µg/kg을 복막으로 1회 투여하고 PTH 10 µg/kg (ZA10 + PTH10군, $n = 5$) 혹은 20 µg/kg을 피하로 하루 한 번 투여한 군(ZA10 + PTH20군, $n = 5$) [21], ZA 20 µg/kg을 복막으로 1회 투여하고 PTH 10 µg/kg (ZA20 + PTH10군, $n = 5$) 혹은 20 µg/kg을 피하로 하루 한 번 투여한 군(ZA20 + PTH20군, $n = 5$)이었다[21]. 약물 투여는 수술 후 1주일 뒤(13주령)부터 시작하였으며, 체중과 전체 골밀도는 수술 전과 치료 시작 후 4주 후에 측정하며 심장천자를 하여 희생시켰다. 희생 시 자궁 위축의 발생을 관찰함으로써 난소 절제가 성공적으로 이루어졌음을 확인하였다.

4. 본 동물실험

생쥐를 12주에 가짜 수술(SHAM군, $n = 8$) 및 난소 절제를 시행하였다. 난소를 절제한 생쥐들은 여섯 군으로 나누었는데, 각각 위약을 투여한 군(OVX 대조군, $n = 8$), ZA 10 µg/kg을 복막으로 한번 투여한 군(ZA군, $n = 8$), OST-4077 100 mg/kg을 하루 2번 매일 경구로 투여한 군(CTKi군, $n = 8$), PTH 10 µg/kg을 경피로 매일 투여한 군(PTH군, $n = 8$), ZA 10 µg/kg을 복막으로 1회 투여하고 PTH 10 µg/kg을 피하로 하루 한 번 투여한 군(ZA + PTH군, $n = 8$), OST-4077 100 mg/kg을 하루 2번 매일 경구로 투여하고 PTH 10 µg/kg을 피하로 하루 한 번 투여한 군(CTKi + PTH군, $n = 8$)이었다. 약물의 투여는 수술 후 1주일 뒤(13주령)부터 시작하여 8주간 지속하였으며, 체중과 전체 골밀도는 수술 전과 매 4주마다 측정하며 심장천자를 하여 희생시켰다. 희생 시 자궁 위축의 발생을 관찰함으로써 난소 절

제가 성공적으로 이루어졌음을 확인하였다.

5. 골밀도 측정

전체 골밀도는 Lunar PIXImus densitometer software version 2.10.041 (GE-Lunar Co., Madison, WI, USA)로 측정하였으며, 10개의 다른 쥐를 3번 측정하였을 때에 분산계수(coefficient of variation)는 1.27%이었다.

6. 통계 분석

모든 측정의 결과들은 평균 \pm 표준편차 혹은 평균과 95% 신뢰구간(confidence interval, CI)로 표시하였고, 각 군 간의 변수 차이는 세 군 이상의 모수적 검정은 one way analysis of variance (ANOVA) 및 Tukey's multiple comparison test를 이용하여 분석하였다. 통계적 분석은 통계 분석 소프트웨어 SPSS version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였고, $P < 0.05$ 인 경우를 유의한 경우로 판단하였다.

결 과

동물에 투여하기 전에 실제로 CTk를 억제하는지 확인하기 위한 효소 억제도 분석에서 OST-4077은 사람 CTk를 대조군에 비해 약 $41.9 \pm 9.8\%$ 억제함을 확인하였다(Fig. 1).

예비 실험에서 체중은 수술 전 모든 군에서 유사하였으나, 수술 후 4주 뒤에 SHAM군(19.7 ± 0.4 g)은 난소절제술을 받은 다른 군들에 비해 유의하게 덜 증가하였다($P = 0.001$) (Table 1). 골밀도는 수술 전 모든 군에서 차이가 없었으나, 치료 후에는 OVX 대조군에 비해 SHAM군($P = 0.001$), ZA10군($P = 0.013$), ZA20군($P < 0.001$),

ZA10 + PTH10군($P < 0.001$), ZA10 + PTH20군($P < 0.001$), ZA20 + PTH10군($P < 0.001$), ZA20 + PTH20군($P < 0.001$)에서 유의하게 증가하였으며, CTki군에서도 증가하는 경향을 보였다($P = 0.088$) (Table 1). CTki 투여 시와 유사한 골밀도 변화를 보인 ZA군은 ZA10 군으로 CTki군과의 차이가 1.8% (95% CI, -3.8 to 7.3)로 유의한 차이가 없어 본 실험에서는 ZA 10 $\mu\text{g/kg}$ 을 투여하기로 결정하였다(Fig. 2). 또한, ZA 10 $\mu\text{g/kg}$ 에 PTH 10 $\mu\text{g/kg}$ 혹은 20 $\mu\text{g/kg}$ 을 병용 투여할 때에 ZA10군에 비해 각각 2.6% 혹은 4.4%의 증가가 있었으며, ZA 20 $\mu\text{g/kg}$ 에 PTH 10 $\mu\text{g/kg}$ 혹은 20 $\mu\text{g/kg}$ 을 병용 투여할 때에 ZA20군에 비해 각각 2.4% 혹은 4.8%의 증가를 보였다(Fig. 2). 따라서, ZA에 의해 PTH의 골 형성 작용이 둔화되는 효과를 보기 위한 PTH의 용량을 10 $\mu\text{g/kg}$ 으로 투여하기로 결정하였다.

본 실험에서는 Fig. 3에서 보이는 것처럼 체중은 수술 전 모든 군에서 유사하였으나, SHAM군이 수술 후 4주 뒤에 21.6 ± 1.5 g으로 덜 증가하는 경향을 보였으며($P = 0.093$), 연구 종료 시점에서는 23.4 ± 1.5 g으로 유의하게 덜 증가하였다($P < 0.05$). 골밀도는 수술 전 모

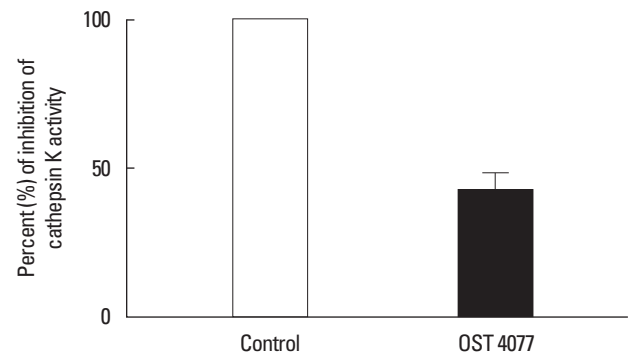


Fig. 1. Inhibition of human cathepsin K activity by OST-4077.

Table 1. Body weight and whole body BMD before starting treatments and at the end of treatments during the preliminary experiment (n = 5 in each group)

Group	Weight (g)			BMD (g/cm ²)		
	Baseline	After 4 wk	P value*	Baseline	After 4 wk	P value*
SHAM	18.6 \pm 0.1	19.7 \pm 0.4	0.001	0.043 \pm 0.001	0.046 \pm 0.001	0.001
OVX	18.4 \pm 0.7	21.9 \pm 0.8	Ref	0.043 \pm 0.001	0.044 \pm 0.001	Ref
CTKi	18.4 \pm 0.3	21.0 \pm 0.5	NS	0.042 \pm 0.001	0.044 \pm 0.001	0.088
ZA10	18.3 \pm 0.1	22.4 \pm 1.3	NS	0.042 \pm 0.001	0.045 \pm 0.001	0.013
ZA20	18.4 \pm 0.3	22.2 \pm 0.7	NS	0.042 \pm 0.001	0.046 \pm 0.000	< 0.001
ZA10 + PTH10	18.4 \pm 0.6	22.6 \pm 1.0	NS	0.042 \pm 0.000	0.046 \pm 0.001	< 0.001
ZA10 + PTH20	18.4 \pm 0.4	22.1 \pm 0.5	NS	0.042 \pm 0.001	0.047 \pm 0.001	< 0.001
ZA20 + PTH10	18.4 \pm 0.5	22.0 \pm 0.8	NS	0.043 \pm 0.001	0.049 \pm 0.000	< 0.001
ZA20 + PTH20	18.4 \pm 1.0	22.1 \pm 0.3	NS	0.042 \pm 0.001	0.050 \pm 0.001	< 0.001

*P value vs. OVX control at the end of treatments by analysis of variance with post-hoc analysis.

SHAM, sham-operated mice; OVX, ovariectomized mice; CTki, ovariectomized mice orally administered with OST-4077 100 mg/kg twice a daily; ZA10 and ZA20, ovariectomized mice intraperitoneally injected with zoledronic acid 10, 20 $\mu\text{g/kg}$ once; ZA10 + PTH10 and ZA10 + PTH20, ovariectomized mice intraperitoneally injected with zoledronic acid 10 $\mu\text{g/kg}$ once and subcutaneously injected with teriparatide 10, 20 $\mu\text{g/kg}$ daily; ZA20 + PTH10 and ZA20 + PTH20, ovariectomized mice intraperitoneally injected with zoledronic acid 20 $\mu\text{g/kg}$ once and subcutaneously injected with teriparatide 10, 20 $\mu\text{g/kg}$ daily. BMD, bone mineral density; CTki, cathepsin K inhibitor; NS, not significant; OVX, ovariectomized; PTH, parathyroid hormone; ZA, zoledronic acid.

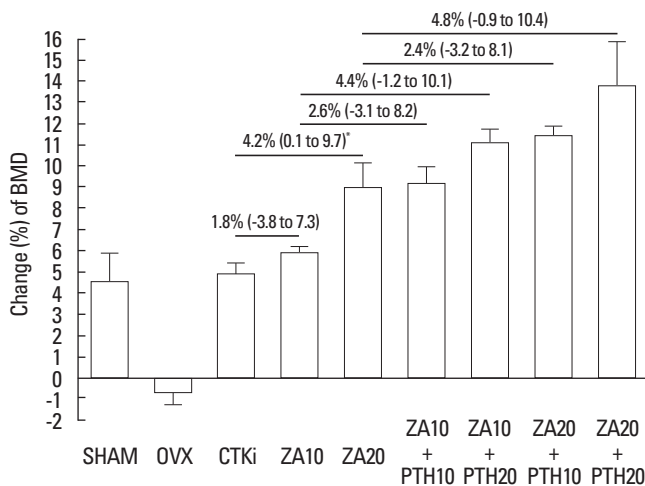


Fig. 2. Change of whole body bone mineral density (BMD) during the preliminary experiment. * $P < 0.05$ vs. CTki group. SHAM, sham-operated mice; OVX, ovariectomized mice; CTki, ovariectomized mice orally administered with OST-4077 100 mg/kg twice a day; ZA10 and ZA20, ovariectomized mice intraperitoneally injected with zoledronic acid 10, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ once; ZA10 + PTH10 and ZA10 + PTH20, ovariectomized mice intraperitoneally injected with zoledronic acid 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ once and subcutaneously injected with teriparatide 10, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ daily; ZA20 + PTH10 and ZA20 + PTH20, ovariectomized mice intraperitoneally injected with zoledronic acid 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ once and subcutaneously injected with teriparatide 10, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ daily. CTki, cathepsin K inhibitor; OVX, ovariectomized; PTH, parathyroid hormone; ZA, zoledronic acid.

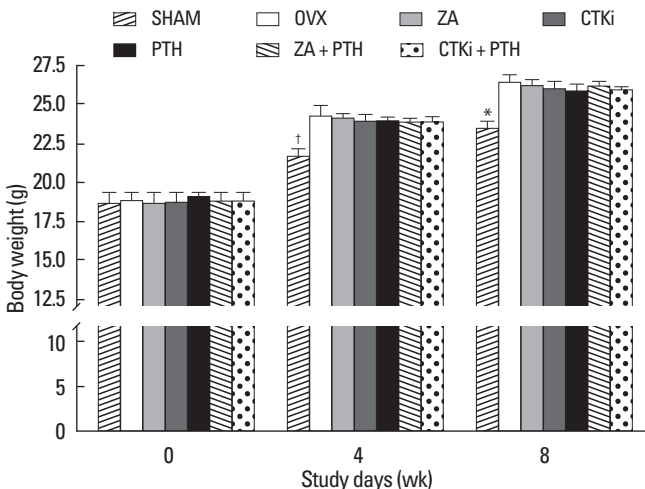


Fig. 3. Body weight before starting treatments and at the end of treatments during the main experiment ($n = 8$ in each group). * $P < 0.05$. † $P < 0.10$ vs. OVX control group. SHAM, sham-operated mice; OVX, ovariectomized mice; ZA, ovariectomized mice intraperitoneally injected with zoledronic acid 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ once; CTki, ovariectomized mice orally administered with OST-4077 100 mg/kg twice a day; PTH, ovariectomized mice subcutaneously injected with teriparatide 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ daily; ZA + PTH, ovariectomized mice intraperitoneally injected with zoledronic acid 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ once and subcutaneously injected with teriparatide 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ daily; CTki + PTH, ovariectomized mice orally administered with OST-4077 100 mg/kg twice a day and subcutaneously injected with teriparatide 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ daily. BMD, bone mineral density; CTki, cathepsin K inhibitor; OVX, ovariectomized; PTH, parathyroid hormone; ZA, zoledronic acid.

은 군에서 유의한 차이가 없었으나(Fig. 4), 치료 4주 후에는 OVX 대조군에 비해 SHAM군($P = 0.001$), PTH군($P = 0.001$), ZA + PTH군($P = 0.001$), CTki + PTH군($P < 0.001$)에서 유의하게 증가하였다(Fig. 4). 치료 8주 후에는 OVX 대조군에 비해 SHAM군($P < 0.001$), ZA군($P = 0.048$), CTki군($P = 0.027$), PTH군($P = 0.018$), ZA + PTH군($P < 0.001$), CTki + PTH군($P < 0.001$)에서 유의하게 증가하였다(Fig. 4). PTH군과 ZA + PTH군, CTki + PTH군 간의 골밀도 차이는 치료 4주경에 유의하지 않았으나, 연구 종료 시점에서는 CTki + PTH군에서 $0.003 \text{ g}/\text{cm}^2$ (95% CI, 0.001 to 0.005)로 ZA + PTH군의 $0.001 \text{ g}/\text{cm}^2$ (95% CI, -0.001 to 0.003)에 비해 PTH군과 유의한 골밀도 차이를 보였다($P = 0.001$) (Fig. 4). 골밀도의 변화는 치료 4주 후에 OVX 대조군에 비해 SHAM군($P < 0.001$), ZA군($P = 0.013$), CTki군($P = 0.011$), PTH군($P < 0.001$), ZA + PTH군($P < 0.001$), CTki + PTH군($P < 0.001$)에서 유의하게 증가하였다(Fig. 5). 치료 8주 후에는 OVX 대조군에 비해 SHAM군($P < 0.001$), ZA군($P = 0.001$), CTki군($P < 0.001$), PTH군($P = 0.001$), ZA + PTH군($P < 0.001$), CTki + PTH군($P < 0.001$)에서 유의하게 증가하였다(Fig. 5). ZA군과 ZA + PTH군 간의 골밀도 변화의 차이는 치료 4주경에 5.1% (95% CI, -1.0 to 10.0)로 증가하는 경향이 보였으나($P = 0.056$), 치료 8주 후에는 3.3% (95%

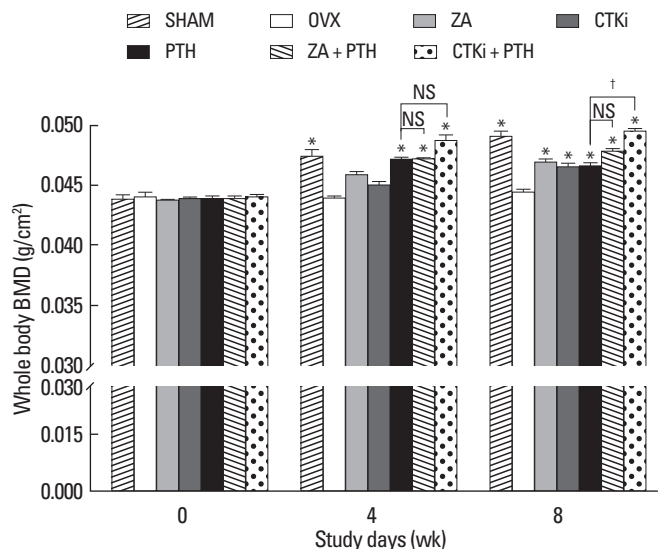


Fig. 4. Whole body bone mineral density (BMD) before starting treatments and at the end of treatments during the main experiment ($n = 8$ in each group). * $P < 0.05$ vs. OVX control group. † $P < 0.05$ vs. PTH group. SHAM, sham-operated mice; OVX, ovariectomized mice; ZA, ovariectomized mice intraperitoneally injected with zoledronic acid 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ once; CTki, ovariectomized mice orally administered with OST-4077 100 mg/kg twice a day; PTH, ovariectomized mice subcutaneously injected with teriparatide 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ daily; ZA + PTH, ovariectomized mice intraperitoneally injected with zoledronic acid 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ once and subcutaneously injected with teriparatide 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ daily; CTki + PTH, ovariectomized mice orally administered with OST-4077 100 mg/kg twice a day and subcutaneously injected with teriparatide 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ daily. CTki, cathepsin K inhibitor; NS, not significant; OVX, ovariectomized; PTH, parathyroid hormone; ZA, zoledronic acid.

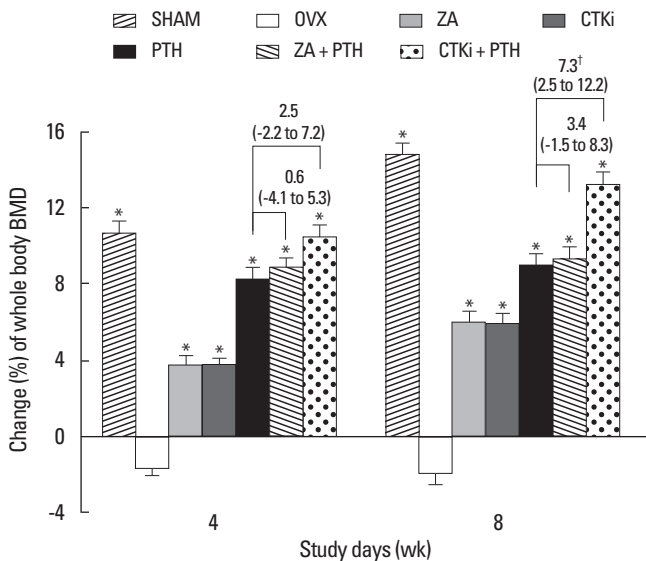


Fig. 5. Change of whole body bone mineral density (BMD) before starting treatments and at the end of treatments during the main experiment ($n = 8$ in each group). * $P < 0.05$ vs. OVX control group. [†] $P < 0.05$ vs. PTH group. SHAM, sham-operated mice; OVX, ovariectomized mice; ZA, ovariectomized mice intraperitoneally injected with zoledronic acid 10 μ g/kg once; CTki, ovariectomized mice orally administered with OST-4077 100 mg/kg twice a day; PTH, ovariectomized mice subcutaneously injected with teriparatide 10 μ g/kg daily; ZA + PTH, ovariectomized mice intraperitoneally injected with zoledronic acid 10 μ g/kg once and subcutaneously injected with teriparatide 10 μ g/kg daily; CTki + PTH, ovariectomized mice orally administered with OST-4077 100 mg/kg twice a day and subcutaneously injected with teriparatide 10 μ g/kg daily; CTki, cathepsin K inhibitor; OVX, ovariectomized; PTH, parathyroid hormone; ZA, zoledronic acid.

CI, -2.1 to 8.7)로 유의한 증가는 없었다. PTH군과 ZA + PTH군, CTki + PTH군 간의 골밀도 변화의 차이는 치료 4주경에 유의하지 않았으나, 치료 종료 후에는 PTH군에 비해 ZA + PTH군에서 3.4% (95% CI, -1.5 to 8.3)로 유의한 증가는 없었으나 CTki + PTH군에서는 7.3% (95% CI, 2.5 to 12.2)로 유의하게 증가하였다($P = 0.001$) (Fig. 5).

고 찰

본 연구에서 비스포스포네이트를 PTH와 병용 시에 PTH 단독 요법에 비해 유의한 골 양의 증가는 관찰할 수 없었는데 이는 사람을 대상으로 하였던 다른 연구 결과들과 일치하였다[5,6]. 반면에 CTki를 PTH와 병용 시에는 흥미롭게도 단독 요법에 비해 골 양이 유의하게 증가되는 것을 확인하였다.

CTki와 비스포스포네이트를 PTH와 병용할 때 PTH의 골 형성 작용에 대한 두 약제 간의 차이는 골 흡수 억제 효과의 차이 보다는 파골세포 수에 대한 효과의 차이 때문이라고 추정된다. 비스포스포네이트를 PTH와 병용 시에 PTH의 골 형성 작용을 감소시키는 현상을 설명하는 기전으로 골재형성 과정에서 골 흡수와 골 형성이 순차적으로 일어나는 짝짓기 현상의 억제가 제시되고 있다[7]. 최근에

는 짝짓기 조절인자들이 전통적으로 중요하다고 알려져 왔던 골 흡수 단계 과정보다는 파골세포 자체에서 분비되기 때문에, 짝짓기 현상이 파골세포 수와 밀접한 관계가 있다는 근거들이 제시되고 있다[7,22-24]. 이런 관점에서 PTH와 비스포스포네이트 병용 요법에 의한 결과는 비스포스포네이트가 파골세포의 세포 자멸사를 증가시켜 파골세포 수를 감소시키기 때문에[25,26], 파골세포에서 나오는 짝짓기 조절인자들도 감소하여 PTH에 의한 골 형성이 감소된 것이라 추정할 수 있다. 반면에, 1) CTki가 결핍 되어 있는 동물모델이나[14], 2) CTki의 효과가 유전적으로 감소된 pycnodysostosis 환자의 일부[24], 3) CTki를 동물에게 처치한 경우[13,16]들에서 보이는 것처럼 CTki가 억제될 때 골 흡수는 억제되지만 비스포스포네이트와는 달리 파골세포의 수에는 영향을 끼치지 않으며 골 형성 효과에는 영향을 끼치지 않는다고 보고되었다. 이러한 결과들은 CTki를 PTH와 병용 시에 PTH에 의한 골 형성 효과가 유지될 가능성이 있음을 시사한다. 기대했던 대로 본 연구의 결과에서 CTki를 PTH와 병용 시에 비스포스포네이트와는 달리 PTH 단독 요법에 비해 유의한 골 양의 증가를 보여 이러한 가설을 추정할 수 있었다. 또한 본 연구가 진행되는 동안 PTH와 비스포스포네이트인 알렌드로네이트(alendronate, ALN) 혹은 CTki인 KK1-300-01 병용요법에 대한 연구가 발표되었다[27]. 골조직형태측 분석과 골 형성 표지자 결과상 PTH 사용과 무관하게 ALN은 파골세포 수와 골 형성 작용을 감소시키나, CTki는 파골세포 수와 골 형성 작용을 감소시키지 않았다. 또한 PTH와 병용 시에 CTki는 ALN과는 달리 PTH의 골 형성 작용을 증가시켰다. 이러한 결과들은 본 연구의 가설과 결과에 일치하였다.

추가적으로, 비스포스포네이트에 비해 골 흡수 억제 정도가 약한 탈록시펜은 PTH와 병용 시에 골 양 증가에 대한 상승 효과를 보였기 때문에[28], 골 흡수 억제 정도가 PTH의 골 형성 작용에 영향을 끼칠 수 있다는 가능성을 배제하기 위해 OST-4077과 유사한 골 흡수 억제 정도를 보이는 비스포스포네이트의 용량을 확인 후 실험을 진행하였다. 골 흡수 억제 정도가 CTki와 유사한 용량을 쓴 비스포스포네이트에서 PTH에 의한 골 형성이 역시 감소되어, 골 흡수 억제 정도보다는 파골세포에 대한 영향이 더 중요함을 확인할 수 있었다.

현재 쓰이고 있는 골다공증 치료제 중 가장 널리 사용되는 골 흡수 억제제인 비스포스포네이트는 골 흡수 표지자를 80%까지 감소시킬 정도로 강력한 골 흡수 억제 작용이 있지만 골밀도의 급격한 증가가 치료 시작 초기에만 관찰되고, 3년이 지난 이후에는 연 1% 미만의 증가가 있어 오랜 기간 사용해도 골밀도의 증가가 제한되어 있다[29,30]. 또한 장기간 사용은 비정상적인 대퇴골 전자하부 골절[31], 골절 치유 지연[32], 턱뼈 괴사[33] 등이 야기될 수 있다고 보고되고 있다. 골 형성 촉진제인 간헐적 PTH 주사 요법은 21개월 동안 투여 시 요추 골밀도를 9.7%까지 증가시켰으나[34], 효과와 안전성을 위해 18-24개월 간의 투여만이 허용되고 있다[4]. 따라서, 단일 약제로서는 골다공증 환자에서 단기간에 골밀도를 증가시키는 것이 어

렵기 때문에 골다공증 치료제 병용요법의 필요성이 대두되고 있다. 본 연구의 결과에서 보이는 것처럼 CTKi는 비스포스포네이트와는 달리 짝짓기 현상을 극복할 수 있는 decoupler의 가능성을 가진 약제로 PTH와 병용 시 골 흡수는 억제하면서도 골 형성은 촉진할 수 있어 부작용은 줄이면서 골 양을 단기간에 증가시킬 수 있으리라 기대된다.

본 논문 작성 중에 사람에게서 ZA (5 mg 1회 정주)와 PTH (20 µg/kg 매일 피하 투여)의 병용요법을 1년간 시행한 결과가 발표되었다. 결과를 살펴보면 요추 골밀도는 병용요법군에서 7.5%로 PTH 단독 투여군의 7.0%나 ZA 단독 투여군의 4.4%에 비해 증가하였지만 그 정도가 미미하였고, 대퇴 전체 골밀도는 병용요법군에서 2.3%로 PTH 단독 투여군의 1.1%나 ZA 단독 투여군의 2.2%에 비해 증가하였지만 통계적으로 유의하지 않아 본 실험의 결과와 유사하였다[35].

본 연구의 제한점으로는 골조직형태측 실험을 실시하거나 생화학적 골표지자를 측정하지 못한 것을 지적할 수 있다.

결론적으로, 본 생체 실험을 통해 PTH와 병용 시에 CTKi는 비스포스포네이트와는 달리 짝짓기 현상을 극복하여 골 양을 단기적으로 유의하게 증가시킬 수 있는 것을 확인이 되었다. 향후 다른 동물 모델을 이용한 실험이나 임상연구를 통해 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

배경: 우리는 카텡신 K 억제제와 부갑상선호르몬(1-34)의 병용요법이 골 흡수와 골 형성 간의 짝짓기 현상을 극복하여 단기간에 골 양을 유의하게 증가시킨다고 가정하였다.

방법: 예비 실험에서 골 양에 대해 카텡신 K 억제제인 OST-4077과 유사한 골밀도 변화를 보이는 졸레드론산 농도를 선택하였다. 암컷 생쥐에 난소절제술(OVX군) 혹은 가짜 수술(SHAM군)을 시행하였다. 8주 동안 카텡신 K 억제제(CTKi군), 졸레드론산(ZA군), 부갑상선호르몬(1-34) (PTH군)을 투여하거나 졸레드론산과 부갑상선호르몬(1-34) (ZA + PTH군)을 병용투여하거나, 카텡신 K 억제제와 부갑상선호르몬(1-34) (CTKi + PTH군)을 병용투여하였다. 전체 골밀도를 수술 전, 처치 후 4주, 8주 뒤에 측정하였다.

결과: 예비 실험에서는 졸레드론산 10 µg/kg을 투여 시 카텡신 K 억제제와 유사한 골밀도의 변화를 보였다. 골밀도는 치료 8주 후에 OVX 대조군에 비해 SHAM군, ZA군, CTKi군, PTH군, ZA + PTH군, CTKi + PTH군에서 유의하게 증가하였다. 연구 종료 후 골밀도는 CTKi + PTH군에서 ZA + PTH군과는 달리 PTH군보다 유의하게 증가하였다. 골밀도의 변화는 치료 8주 후에 OVX 대조군에 비해 SHAM군과 ZA군, CTKi군, PTH군, ZA + PTH군, CTKi + PTH군에서 유의하게 증가하였다. 치료 종료 후에 골밀도의 변화는 CTKi + PTH군에서 ZA + PTH군과는 달리 PTH군보다 유의하게 증가하였다.

결론: 카텡신 K 억제제는 부갑상선호르몬과 병용 시 부갑상선호르몬의 골 형성 효과를 증가시켰다. 따라서, 카텡신 K 억제제와 부갑상선호르몬의 병용요법은 짝짓기 현상을 극복하여 단기간에 유의하게 골 양을 증가시킬 수 있는 새로운 치료 전략이 될 수 있음을 시사한다.

참고문헌

1. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy: Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA* 285:785-795, 2001
2. Recker R, Lappe J, Davies KM, Heaney R: Bone remodeling increases substantially in the years after menopause and remains increased in older osteoporosis patients. *J Bone Miner Res* 19:1628-1633, 2004
3. Seeman E, Delmas PD: Bone quality-the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med* 354:2250-2261, 2006
4. Canalis E, Giustina A, Bilezikian JP: Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis. *N Engl J Med* 357:905-916, 2007
5. Black DM, Greenspan SL, Ensrud KE, Palermo L, McGowan JA, Lang TF, Garnero P, Boussein ML, Bilezikian JP, Rosen CJ; PaTH Study Investigators: The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 349:1207-1215, 2003
6. Finkelstein JS, Hayes A, Hunzelman JL, Wyland JJ, Lee H, Neer RM: The effects of parathyroid hormone, alendronate, or both in men with osteoporosis. *N Engl J Med* 349:1216-1226, 2003
7. Karsdal MA, Martin TJ, Bollerslev J, Christiansen C, Henriksen K: Are nonresorbing osteoclasts sources of bone anabolic activity? *J Bone Miner Res* 22:487-494, 2007
8. Nishi Y, Atley L, Eyre DE, Edelson JG, Superti-Furga A, Yasuda T, Desnick RJ, Gelb BD: Determination of bone markers in pycnodysostosis: effects of cathepsin K deficiency on bone matrix degradation. *J Bone Miner Res* 14:1902-1908, 1999
9. Lark MW, Stroup GB, James IE, Dodds RA, Hwang SM, Blake SM, Lechowska BA, Hoffman SJ, Smith BR, Kapadia R, Liang X, Erhard K, Ru Y, Dong X, Marquis RW, Veber D, Gowen M: A potent small molecule, nonpeptide inhibitor of cathepsin K (SB 331750) prevents bone matrix resorption in the ovariectomized rat. *Bone* 30:746-753, 2002
10. Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, Moritz JD, Schu P, von Figura K: Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13453-13458, 1998
11. Bone HG, McClung MR, Roux C, Recker RR, Eisman JA, Verbruggen N, Hustad CM, DaSilva C, Santora AC, Ince BA: Odanacatib, a cathepsin-K inhibitor for osteoporosis: a two-year study in postmenopausal women with low bone density. *J Bone Miner Res* 25:937-947, 2010
12. Eisman JA, Bone HG, Hosking DJ, McClung MR, Reid IR, Rizzoli R, Resch H, Verbruggen N, Hustad CM, DaSilva C, Petrovic R, Santora AC, Ince BA, Lombardi A: Odanacatib in the treatment of postmenopausal women with low bone mineral density: three-year continued therapy and resolution of effect. *J Bone Miner Res* 26:242-251, 2011
13. Kumar S, Dare L, Vasko-Moser JA, James IE, Blake SM, Rickard DJ,

- Hwang SM, Tomaszek T, Yamashita DS, Marquis RW, Oh H, Jeong JU, Veber DF, Gowen M, Lark MW, Stroup G: A highly potent inhibitor of cathepsin K (relacatib) reduces biomarkers of bone resorption both in vitro and in an acute model of elevated bone turnover in vivo in monkeys. *Bone* 40:122-131, 2007
14. Pennypacker B, Shea M, Liu Q, Masarachia P, Saftig P, Rodan S, Rodan G, Kimmel D: Bone density, strength, and formation in adult cathepsin K (-/-) mice. *Bone* 44:199-207, 2009
 15. Stoch SA, Wagner JA: Cathepsin K inhibitors: a novel target for osteoporosis therapy. *Clin Pharmacol Ther* 83:172-176, 2008
 16. Xiang A, Kanematsu M, Kumar S, Yamashita D, Kaise T, Kikkawa H, Asano S, Kinoshita M: Changes in micro-CT 3D bone parameters reflect effects of a potent cathepsin K inhibitor (SB-553484) on bone resorption and cortical bone formation in ovariectomized mice. *Bone* 40:1231-1237, 2007
 17. Kim MK, Kim HD, Park JH, Lim JI, Yang JS, Kwak WY, Sung SY, Kim HJ, Kim SH, Lee CH, Shim JY, Bae MH, Shin YA, Huh Y, Han TD, Chong W, Choi H, Ahn BN, Yang SO, Son MH: An orally active cathepsin K inhibitor, furan-2-carboxylic acid, 1-[1-[4-fluoro-2-(2-oxo-pyrrolidin-1-yl)-phenyl]-3-oxo-piperidin-4-ylcarbamoyl]-cyclohexyl)-amide (OST-4077), inhibits osteoclast activity in vitro and bone loss in ovariectomized rats. *J Pharmacol Exp Ther* 318:555-562, 2006
 18. Brömme D, Okamoto K, Wang BB, Biroc S: Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 271:2126-2132, 1996
 19. Corey E, Brown LG, Quinn JE, Poot M, Roudier MP, Higano CS, Vessella RL: Zoledronic acid exhibits inhibitory effects on osteoblastic and osteolytic metastases of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 9:295-306, 2003
 20. Gasser JA, Green JR, Shen V, Ingold P, Rebmann A, Bhatnagar AS, Evans DB: A single intravenous administration of zoledronic acid prevents the bone loss and mechanical compromise induced by aromatase inhibition in rats. *Bone* 39:787-795, 2006
 21. Zhou H, Iida-Klein A, Lu SS, Ducayen-Knowles M, Levine LR, Dempster DW, Lindsay R: Anabolic action of parathyroid hormone on cortical and cancellous bone differs between axial and appendicular skeletal sites in mice. *Bone* 32:513-520, 2003
 22. Del Fattore A, Peruzzi B, Rucci N, Recchia I, Cappariello A, Longo M, Fortunati D, Ballanti P, Iacobini M, Luciani M, Devito R, Pinto R, Caniglia M, Lanino E, Messina C, Cesaro S, Letizia C, Bianchini G, Fryssira H, Grabowski P, Shaw N, Bishop N, Hughes D, Kapur RP, Datta HK, Taranta A, Fornari R, Migliaccio S, Teti A: Clinical, genetic, and cellular analysis of 49 osteopetrotic patients: implications for diagnosis and treatment. *J Med Genet* 43:315-325, 2006
 23. Karsdal MA, Neutsky-Wulff AV, Dziegiel MH, Christiansen C, Henriksen K: Osteoclasts secrete non-bone derived signals that induce bone formation. *Biochem Biophys Res Commun* 366:483-488, 2008
 24. Segovia-Silvestre T, Neutsky-Wulff AV, Sorensen MG, Christiansen C, Bollerslev J, Karsdal MA, Henriksen K: Advances in osteoclast biology resulting from the study of osteopetrotic mutations. *Hum Genet* 124:561-577, 2009
 25. Hughes DE, Wright KR, Uy HL, Sasaki A, Yoneda T, Roodman GD, Mundy GR, Boyce BF: Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 10:1478-1487, 1995
 26. Kavanagh KL, Guo K, Dunford JE, Wu X, Knapp S, Ebetino FH, Rogers MJ, Russell RG, Oppermann U: The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7829-7834, 2006
 27. Yamane H, Sakai A, Mori T, Tanaka S, Moridera K, Nakamura T: The anabolic action of intermittent PTH in combination with cathepsin K inhibitor or alendronate differs depending on the remodeling status in bone in ovariectomized mice. *Bone* 44:1055-1062, 2009
 28. Deal C, Omizo M, Schwartz EN, Eriksen EF, Cantor P, Wang J, Glass EV, Myers SL, Kregge JH: Combination teriparatide and raloxifene therapy for postmenopausal osteoporosis: results from a 6-month double-blind placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res* 20:1905-1911, 2005
 29. Bone HG, Hosking D, Devogelaer JP, Tucci JR, Emkey RD, Tonino RP, Rodriguez-Portales JA, Downs RW, Gupta J, Santora AC, Liberman UA; Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group: Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. *N Engl J Med* 350:1189-1199, 2004
 30. Udell JA, Fischer MA, Brookhart MA, Solomon DH, Choudhry NK: Effect of the Women's Health Initiative on osteoporosis therapy and expenditure in Medicaid. *J Bone Miner Res* 21:765-771, 2006
 31. Goh SK, Yang KY, Koh JS, Wong MK, Chua SY, Chua DT, Howe TS: Subtrochanteric insufficiency fractures in patients on alendronate therapy: a caution. *J Bone Joint Surg Br* 89:349-353, 2007
 32. Odvina CV, Zerwekh JE, Rao DS, Maalouf N, Gottschalk FA, Pak CY: Severely suppressed bone turnover: a potential complication of alendronate therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1294-1301, 2005
 33. Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, Gagel RF, Gilsanz V, Guise T, Koka S, McCauley LK, McGowan J, McKee MD, Mohla S, Pendrys DG, Raisz LG, Ruggiero SL, Shafer DM, Shum L, Silverman SL, Van Poznak CH, Watts N, Woo SB, Shane E; American Society for Bone and Mineral Research: Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res* 22:1479-1491, 2007
 34. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsman AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK, Wang O, Mitlak BH: Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 344:1434-1441, 2001
 35. Cosman F, Eriksen EF, Recknor C, Miller PD, Gunañens N, Kasperk C, Papanastasiou P, Readie A, Rao H, Gasser JA, Bucci-Rechtweg C, Boonen S: Effects of intravenous zoledronic acid plus subcutaneous teriparatide [rhPTH(1-34)] in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 26:503-511, 2011